



Instructions for Use

Epi proColon 2.0 CE

Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)

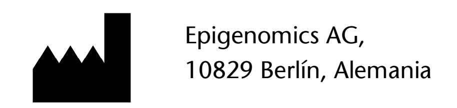
Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)

Epi proColon Control Kit (M5-02-003)

Lea con atención las instrucciones antes de usar y cíñase a ellas para obtener resultados fiables.

IFU 0009ES, rev 5, copyright©, Octubre 2014, Epigenomics AG

REF M5-02-001, M5-02-002, M5-02-003


Epigenomics AG,
10829 Berlín, Alemania



Índice

1. Nombre del producto y uso previsto ... 3
2. Resumen y explicación de la prueba ... 3
3. Principios del procedimiento ... 3
4. Contenido del kit ... 4
4.1. Contenido ... 4
4.2. Informaciones de seguridad ... 4
5. Almacenamiento y conservación ... 5
5.1. Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001) ... 5
5.2. Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) ... 5
5.3. Epi proColon Control Kit (M5-02-003) ... 6
6. Materiales requeridos pero no suministrados ... 6
6.1. Equipamiento genérico de laboratorio ... 6
6.2. Reactivos y otros consumibles de laboratorio ... 6
6.3. Equipamiento especial y consumibles requeridos ... 7
6.4. Requisitos para la instalación ... 7
7. Advertencias y precauciones ... 8
7.1. Medidas de precaución en el laboratorio ... 8
7.2. Medidas de precaución contra infecciones ... 8
8. Recogida y manejo de muestras ... 8
8.1. Recogida de sangre y almacenamiento de sangre ... 8
8.2. Preparación de las muestras de plasma y almacenamiento del plasma ... 8
9. Procedimiento de la prueba ... 9
9.1. Preparación de las soluciones activas ... 9
9.2. Extracción del ADN y conversión bisulfito del plasma de los pacientes ... 9
9.3. Preparación de la PCR ... 13
10. Análisis con los instrumentos PCR 7500 Fast y 7500 Fast Dx de Applied Biosystems ... 14
10.1. Software requerido ... 14
10.2. Preparación de la placa PCR (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems) ... 14
10.3. Carga de la placa (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems) ... 15
10.4. Análisis de resultados (7500 Fast / Fast Dx de Applied Biosystems) ... 18
10.5. Validez de la prueba confirmada con controles Epi proColon (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems) ... 18
10.6. Interpretación de los resultados para una PCR única (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems) ... 19
11. Análisis con el Instrumento I de Roche LightCycler 480 ... 19
11.1. Preparación de la placa (Instrumento I LightCycler 480) ... 19
11.2. Carga de la placa (Instrumento I LightCycler 480) ... 19
11.3. Análisis de los resultados (Instrumento I de LightCycler 480) ... 20
11.4. Validez de la prueba confirmada con los controles Epi proColon (instrumento I de LightCycler 480) ... 21
11.5. Interpretación de los resultados de una PCR individual (Instrumento I LightCycler 480) ... 22
12. Análisis con el instrumento II de Roche LightCycler 480 ... 22
12.1. Preparación de la placa (instrumento II de LightCycler 480) ... 22
12.2. Carga de la placa (instrumento II de LightCycler 480) ... 22
12.3. Análisis de los resultados (instrumento II de LightCycler 480) ... 23
12.4. Criterios de validez para los controles Epi proColon (instrumento II de LightCycler 480) ... 24
12.5. Interpretación de los resultados de reacciones PCR individuales (instrumento II LightCycler 480) ... 24
13. Interpretación de los resultados de una muestra de paciente ... 25
14. Control de calidad ... 25
14.1. Controles externos ... 25
14.2. Controles internos ... 25
15. Limitaciones del ensayo ... 26
16. Datos sobre la eficacia del método ... 26
16.1. Sensibilidad analítica ... 26
16.2. Reproducibilidad ... 26
16.3. Sensibilidad clínica y especificidad ... 27
16.4. Concordancia de los dos instrumentos de PCR en tiempo real ... 27
16.5. Interferencia ... 27
17. Significado de los símbolos ... 28
18. Referencias ... 28
19. Contacto ... 29

1. Nombre del producto y uso previsto

Epi proColon 2.0 CE es un ensayo cualitativo para la detección por PCR en tiempo real de ADN metilado en Septin9 a partir de ADN convertido con bisulfito procedente de muestras de plasma humano. La presencia de Septin9 metilado está asociada al cáncer colorrectal y puede contribuir por lo tanto a su detección.

Epi proColon 2.0 CE incluye Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) y Epi proColon Control Kit (M5-02-003).

2. Resumen y explicación de la prueba

Epi proColon 2.0 CE es un ensayo *in vitro* basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección cualitativa de la metilación del gen Septin9 en ADN aislado en 3,5 ml de plasma del paciente. Los restos de citosina en la región v2 del gen Septin9 están metilados en tejido afectado por cáncer colorrectal (CRC) pero no en la mucosa del colon normal. Esta metilación no es normal y puede ser detectada con amplificación específica del ADN presente en el flujo sanguíneo. La detección de ADN de CRC en plasma mediante el uso del marcador biológico Septin9 metilado se ha confirmado en varios estudios caso-control sobre pacientes con CRC y controles negativos confirmados por colonoscopia[1-3]. El ensayo Epi proColon 2.0 CE realizado en una muestra de sangre ofrece al paciente que niega someterse a la colonoscopia de cribado, una alternativa válida a las demás opciones no invasivas.

3. Principios del procedimiento

Epi proColon 2.0 CE se divide en dos fases. En la primera fase se realiza la extracción del ADN del plasma seguido por la conversión con bisulfito del ADN purificado usando Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001). En la segunda fase, el ADN tratado con bisulfito (bisDNA) es sometido a un ensayo dúplex PCR usando Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) detectándose el ADN metilado en Septin9 y un control interno, ADN ACTB (ß-actina), que permite evaluar si el ADN disponible es adecuado. Los controles incluidos en el Epi proColon Control Kit (M5-02-003) son obligatorios como controles positivos y negativos para cada ensayo.

La extracción del ADN del plasma del paciente se realiza mediante la adhesión del ADN libre circulante a partículas magnéticas, procediendo luego a separarlas del plasma gracias a un soporte magnético. Las eventuales impurezas se eliminan de las partículas magnéticas en las fases de lavado. La fase de elución sirve para separar el ADN purificado de las partículas magnéticas disolviéndolo en el tampón de elución.

El ADN contenido en el tampón de elución será sometido a una reacción química que modificará específicamente los residuos de citosina no metilada en el ADN.. El tratamiento con bisulfito es el método de elección para analizar la metilación del ADN. La conversión se basa en la adición nucleofílica de un ion bisulfito a la citosina de un nucleótido con la consiguiente reacción de desaminación para dar sulfonato de uracilo, mientras que la 5-metilcitosina (citosina metilada) no experimenta la reacción de desaminación y permanece invariable.

Los bloqueadores y las sondas usados en la reacción PCR distinguen entre las secuencias metiladas y las no metiladas. Epi proColon 2.0 CE detecta una secuencia bisDNA que contiene sitios CpG metilados en la región v2 del gen Septin9 y el bisDNA total de una región del gen ACTB. La porción del ensayo dúplex relacionada a Septin9 consiste en cebadores ubicados en regiones genéticas sin dinucleótidos CpG. Una vez ha tenido lugar la conversión con bisulfito dentro de la región, se añade un bloqueador específico para las secuencias no metiladas de manera que se amplifica preferentemente las secuencias metiladas. Se usa una sonda de detección fluorescente específica para el gen Septin9 metilado con el fin de identificar únicamente las secuencias metiladas amplificadas en la reacción PCR4.

4. Contenido del kit

4.1. Contenido

Tabla 1: Contenido del Epi proColon Plasma Quick Kit.

Reactivo	Recipientes	Volumen	Temperatura de almacenaje
Epi proColon Lysis Binding Buffer	1 frasco	125 ml	de 15° C a 30° C
Epi proColon Wash A Concentrate	1 frasco	60 ml	de 15° C a 30° C
Epi proColon Magnetic Beads	1 frasco	4 ml	de 15° C a 30° C
Epi proColon Wash B Concentrate	1 frasco	7 ml	de 15° C a 30° C
Epi proColon Elution Buffer	1 tubo	6 ml	de 15° C a 30° C
Epi proColon Bisulfite Solution	4 tubos	de 1,9 ml cada uno	de 15° C a 30° C
Epi proColon Protection Buffer	1 tubo	1 ml	de 15° C a 30° C

Tabla 2: Contenido del Epi proColon Sensitive PCR Kit.

Reactivo	Recipientes	Volumen	Temperatura de almacenaje
Epi proColon PCR Mix	2 tubos	810 µl cada uno	de -25° C a -15° C
Epi proColon Polymerase	1 tubo	85 µl	de -25° C a -15° C

Tabla 3: Contenido del Epi proColon Control Kit.

Reactivo	Recipientes	Volumen	Temperatura de almacenaje
Epi proColon Negative Control	6 tubos	de 3,65 ml cada uno	de -25° C a -15° C
Epi proColon Positive Control	6 tubos	3,65 ml cada uno	de -25° C a -15° C

4.2. Informaciones de seguridad

Siempre que se trabaje con productos químicos, llevar bata de laboratorio y usar guantes desechables. Lavar con agua las superficies contaminadas. Para más información, consultar las fichas de datos de seguridad (MSDS) en nuestra página web (http://www.epiprocolon.com/en/laboratories/septin9-test/safety-data-sheets.html).

Epi proColon Lysis Binding Buffer y Epi proColon Wash A Concentrate: contienen TRITON X-100 y tiocianato de guanidinio

Indicaciones de peligro: EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos; H302: Nocivo en caso de ingestión; H312: Nocivo en contacto con la piel; H318: Provoca lesiones oculares graves; H332: Nocivo en caso de inhalación; H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia: P261: Evitar respirar el aerosol; P273: Evitar su liberación al medio ambiente; P301 + P312: EN CASO DE INGESTÍON: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico en caso de malestar; P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes; P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.





Epi proColon Bisulfite Solution: contiene una solución acuosa de bisulfito de amonio (Sulfito ácido de amonio)

Indicaciones de peligro: EUH031: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos; H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

Consejos de prudencia: P264: Lavarse las manos concienzudamente tras la manipulación; P271: Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado; P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección; P305+351+338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando; P312: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico en caso de malestar.





Epi proColon Protection Buffer: contiene ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metil-croman-2-carboxílico, alcohol tetrahidrofurfurílico

Indicaciones de peligro: H319: Provoca irritación ocular grave.

Consejos de prudencia: P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.





Epi proColon Wash B Concentrate, Epi proColon Elution Buffer, Epi proColon Magnetic Beads, Epi proColon PCR Mix, Epi proColon Polymerase, Epi proColon Positive Control y Epi proColon Negative Control no son nocivos.

5. Almacenamiento y conservación

Los reactivos suministrados con el Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), con el Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) y con el Epi proColon (M5-02-003) Control Kit son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manejados correctamente. No usar los productos pasada la fecha de caducidad. No mezclar componentes de diferentes lotes.

5.1. Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)

30 °C
15 °C

Almacenar todos los reactivos del Epi proColon Plasma Quick Kit a entre 15 y 30 °C.

Epi proColon Bisulfite Solution es sensible al contacto con oxígeno. Usar sólo tubos de Epi proColon Bisulfite Solution que no hayan sido abiertos antes. Desechar los tubos usados.

Almacenar el tampón Epi proColon Wash A Buffer y el tampón Epi proColon Wash B Buffer reconstituidos a entre 15 y 30 °C durante un máximo de seis semanas.

Después del primer uso almacenar todos los reactivos durante un máximo de 6 semanas a entre 15 y 30 °C.

5.2. Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)

-15 °C
-25 °C

Almacenar Epi proColon PCR Mix y Epi proColon Polymerase a entre -25 y -15 °C.

Epi proColon PCR Mix se puede descongelar y volver a congelar una única vez. Después del primer uso almacenar todos los reactivos durante un máximo de 6 semanas a entre -25 y -15 °C.

5.3. Epi proColon Control Kit (M5-02-003)

-15 °C
-25 °C

Almacenar Epi proColon Control Kit a entre -25 y -15 °C.

6. Materiales requeridos pero no suministrados

6.1. Equipamiento genérico de laboratorio

A continuación se indica el equipamiento genérico de laboratorio requerido para realizar la prueba Epi proColon 2.0 CE. Todo equipamiento de laboratorio se debería instalar, calibrar, usar y mantener en conformidad con las recomendaciones del fabricante.

Equipamiento queride	*Equipamiento recomendado*
Gradilla para tubos de 15 ml y 2 ml	n. ref. 211-0200 de VWR International o equivalente
Agitador rotativo	n. ref. 445-2102 de VWR International; n. ref. Y549.1 deCarl Roth GmbH + Co. KG o equivalente
Agitador vórtex	n. ref. 444-1372 de VWR International o equivalente
Termoagitador para tubos de 2 ml	ThermoMixer® C de Eppendorf, n. ref. 5382 000.015, o con termobloque en seco 2 ml de Eppendorf, n. ref. 5362 000.035 o equivalente
Pipetas de volumen regulable para 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf Reference®, n. ref. 4910 000.042 y 4910 000.069 de Eppendorf o equivalente
Pipetador de repetición que permita dosificar repetidamente un volumen regulable	Multipette® M4 de Eppendorf, n. ref. 4982 000.012 o HandyStep® electronic de Brand, n. ref. 705000/705001 o equivalente
Centrífuga de sobremesa con rotor para tubos de 1,5/2,0 ml	centrífuga 5418 de Eppendorf, n. ref. 5418 000.017 con rotor F-45-30-11 de Eppendorf, n. ref. 5490 015.002 o equivalente
Pipeta multicanal	Eppendorf Research® plus 8-Channel, 10 - 100 µl, de Eppendorf, n. ref. 3122 000.035 o equivalente
Centrífuga para placas microtituladoras PCR	centrífuga 5804 R de Eppendorf, n. ref. 5804 000.013, con rotor A-2-DWP, Eppendorf, n. ref. 5804 740.009, o equivalente
Cilindro graduado de 100 ml o pipeta serológica de 50 ml	Carl Roth, n. ref. C177.2 o equivalente, o Fisher Scientific, n. ref. 11889181 o equivalente

6.2. Reactivos y otros consumibles de laboratorio

Reactivos y otros consumibles	*Reactivos y otros consumibles recomendados*
Etanol absoluto (para biología molecular, ≥99,5 %)	Merck KGaA, n. ref. 1.08543.0250 o equivalente
Tubos de centrífuga de polipropileno de 15 ml con fondo cónico, PP/estéril	Sarstedt, n. ref. 62.554.502 o equivalente
Microtubos de 2,0 ml de fondo redondo y tapa de seguridad (PP)	Sarstedt SafeSeal, n. ref. 72.695.400 o Eppendorf Safe-Lock™, n. ref. 0030 120.094 o equivalente
Puntas de pipeta con barrera antiaerosoles	ep Dualfilter T.I.P.S.® de Eppendorf: ▪ 2 – 100 µl, n. ref. 0030 077.547 o equivalente ▪ 50 – 1000 µl, n. ref. 0030 077.571 o equivalente
Puntas para pipetas para volúmenes de 0,5 ml, 1 ml, 10 ml, 25 ml	Combitips advanced® de Eppendorf: ▪ 0,5 ml, n. ref. 0030 089.421 o equivalente ▪ 1 ml, n. ref. 0030 089.430 o equivalente ▪ 10 ml, n. ref. 0030 089.464 o equivalente ▪ 25 ml, n. ref. 0030 089.472 o equivalente
Pipetas de transferencia desechables en embalaje a granel no estéril, de 15 cm de longitud, diámetro del cuello: 5 mm, capacidad aprox. 5 ml	pipetas de transferencia desechables graduadas no estériles VWR, n. ref. 612-4520 o equivalente
Pipetas de transferencia desechables en embalaje a granel no estéril, de 22,5 cm de longitud, diámetro del cuello: 5 mm, capacidad aprox. 5 ml	pipetas de transferencia graduadas desechables de Carl Roth, n. ref. EA61.1, o equivalente
Placas de 96 pocillos para almacenamiento de ADN	placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp® Fast, 0,1 ml, Applied Biosystems (Life Technologies Co.), n. ref. 4346906 o equivalente

Reactivos y otros consumibles	*Reactivos y otros consumibles recomendados*
Film adhesivo para placa de almacenamiento de ADN	film de sellado termorresistente para PCR, n. ref. 391-1254 o Eppendorf Storage Foil (autoadhesivo), n. ref. 0030 127.889 o equivalente
Aplicador para pegar el film adhesivo correctamente a la placa	MicroAmp® Adhesive Film Applicator de Applied Biosystems, n. ref. 4333183
Bolsitas de plástico sellables, 10 x 15 cm para desechar las placas PCR usadas	Carl Roth, n. ref. P279.2 o equivalente
Criovial, 5 ml, fondo con soporte para permanecer de pie	VWR, n. ref. 479-1218 o equivalente
Tubos de recogida de sangre	▪ Tubos para extracción de sangre por vacío de 10 ml BD Vacutainer® K2EDTA (Becton Dickinson, n. ref. 367525) o ▪ S-Monovette® de 9 ml K3E (Sarstedt, n. ref. 02.1066.001) o ▪ S-Monovette® de 8,5 ml CPDA (Sarstedt, n. ref. 01.1610.001)

6.3. Equipamiento especial y consumibles requeridos

Para realizar la prueba Epi proColon 2.0 CE se requieren los siguientes consumibles y equipamientos especiales, no reemplazables por otros equivalentes.

Si la prueba Epi proColon 2.0 CE se realiza con los **instrumentos 7500 Fast o 7500 Fast Dx PCR de Applied Biosystems**:

- Instrumento Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR con software para la detección de secuencias v1.4 21 CFR Part 11 Module (Life Technologies Co., n. ref. 4406984 o 4406985) o
- Instrumento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies Co., catalog no. 4351106 or 4351107) con software para la detección de secuencias v1.4 21 CFR Part 11 Module (Life Technologies Co., n. ref. 4377355)
- Placa de reacción de 96 pocillos con código de barras MicroAmp® Fast Optical, 0,1 ml (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 20 placas, n. ref. 4346906; 200 placas, n. ref. 4366932)
- Film adhesivo óptico de 96 y 384 pocillos MicroAmp® (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 25 films, n. ref. 4360954 o 100 films, n. ref. 4311971)

Si la prueba Epi proColon 2.0 CE se realiza con los **instrumentos LightCycler 480 I o II de Roche**:

- Instrumento I LightCycler 480 con termobloque de 96 pocillos (Roche, n. ref. 05015278001) y con versión del software 1.5.x o

  Instrumento II LightCycler 480 con termobloque de 96 pocillos (Roche, n. ref. 05015278001) y con versión del software 1.5.x
- Placa de 96 pocillos Multiwell LightCycler 480 (blanca) con films de sellado (Roche, n. ref. 04729692001)
- Film de sellado LightCycler 480 (Roche, n. ref. 04729757001)

Equipamiento adicional requerido compatible con todas las configuraciones de PCR en tiempo real:

- Separador magnético: Imán DynaMag™-15 (Invitrogen, n. ref. 123.01D)
- Separador magnético: Imán DynaMag™-2 (Invitrogen, n. ref. 123.21D)

6.4. Requisitos para la instalación

La instalación, calibración, comprobación del rendimiento y el mantenimiento de los instrumentos 7500 Fast Dx PCR y 7500 Fast PCR de Applied Biosystems, y los instrumentos LightCycler 480 I y LightCycler 480 II de Roche, deben realizarse siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota:

La calibración mensual de los instrumentos 7500 Fast Dx PCR y 7500 Fast PCR de Applied Biosystems es obligatoria, tal y como se describe en el protocolo de mantenimiento del fabricante.

Los instrumentos 7500 Fast Dx y 7500 Fast PCR de Applied Biosystems precisan de un mantenimiento semestral que incluya la calibración de los fluorocromos FAM™, JOE™, TAMRA™, según las instrucciones del fabricante.

7. Advertencias y precauciones

7.1. Medidas de precaución en el laboratorio

Es imprescindible atenerse a las buenas prácticas de laboratorio para minimizar el riesgo de contaminación entre las muestras durante o después de la extracción del ADN, la conversión con bisulfito y la purificación.

Durante el proceso de extracción, evitar la contaminación de las muestras con nucleasas. Se recomienda el uso de pipetas y puntas de pipetas monouso para prevenir la contaminación cruzada en las muestras de los pacientes. El procedimiento está concebido para su uso en laboratorios profesionales y asume familiaridad con métodos de extracción del ADN y ensayos PCR en tiempo real.

Para prevenir la contaminación por amplicones generados por PCR previas, recomendamos la estricta separación de las actividades pre-PCR (p. ej. extracción de ADN plasmático o preparación de la PCR) y las actividades post-PCR (p. ej. PCR en tiempo real). Recomendamos además desechar las placas PCR usadas de modo que no liberen productos PCR. Por ejemplo, colocar las placas PCR usadas dentro de una bolsita de plástico sellable inmediatamente después de sacarlas del instrumento PCR; cerrar dicha bolsita y desecharlas en un contenedor de basura adecuado. No almacenar nunca una placa PCR usada después de ser sacada del instrumento PCR. No abrir nunca una placa PCR usada.

7.2. Medidas de precaución contra infecciones

El producto no contiene sustancias ni agentes patógenos que puedan causar enfermedades en personas o animales.

Las muestras de sangre y de plasma humanos analizadas en este ensayo deberán ser manipuladas como potencialmente infecciosas, ateniéndose a protocolos de seguridad en el laboratorio como los procedimientos indicados en la Directiva Europea 2000/54/CE sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo o demás normativas sobre seguridad biológica.

8. Recogida y manejo de muestras

8.1. Recogida de sangre y almacenamiento de sangre

La recogida y el almacenamiento de la muestra de sangre se pueden realizar de acuerdo con las siguientes condiciones:

- Para la toma de la muestra de sangre usar tubos Vacutainer® K_2EDTA de 10 ml o S-Monovette® Potassium-EDTA de 9 ml. Seguir las recomendaciones del fabricante para realizar la recogida de la sangre. La sangre debe procesarse inmediatamente. La sangre puede ser almacenada a una temperatura entre 2 y 8 °C durante un máximo de 24 horas antes de la preparación del plasma. No congelar las muestras de sangre.
- Alternativamente, se pueden utilizar tubos S-Monovette® CPDA de 8,5 ml para la recogida de la sangre. Seguir las recomendaciones del fabricante para realizar la recogida de la sangre. La sangre debe procesarse inmediatamente. La duración máxima del almacenamiento de la sangre en tubos S-Monovette® CPDA es de 48 horas a una temperatura entre 15 y 25 °C. No congelar las muestras de sangre.

8.2. Preparación de las muestras de plasma y almacenamiento del plasma

- Deshabilitar la función de freno de la centrífuga para evitar que se rompa la capa de células.
- Centrifugar la sangre en los tubos de recogida de muestra durante 12 minutos a 1350 ± 150 fcr. Para realizar la conversión de revoluciones por minuto (rpm) a fuerza centrífuga relativa (fcr) consultar el manual de uso de la centrífuga.
- Retirar el tubo de la centrífuga.
- Usar una pipeta de transferencia nueva desechable de 15 cm para transferir el plasma del tubo de recogida a un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 ml de fondo cónico.
- Centrifugar el plasma en el tubo de centrífuga de 15 ml durante 12 minutos a 1350 ± 150 fcr.

- Usando una pipeta de transferencia nueva desechable de longitud extra (22,5 cm) o una pipeta serológica, transferir 3,5 ml de plasma a un criovial etiquetado o a un tubo de centrífuga.
- Las muestras de plasma pueden ser almacenadas entre -15 y -25 °C durante 4 semanas como máximo.
- Usando los tubos Vacutainer® K_2EDTA de 10 ml, la muestra de plasma se puede almacenar entre 2 y 8 °C durante un máximo de 18 horas.

Nota: Tenga cuidado de no perturbar o transferir la capa leucocitaria (glóbulos blancos) por encima de las células rojas de la sangre en el tubo de recogida de sangre después de la primera centrifugación, o sedimentado en el fondo del tubo de centrífuga cónico después de la segunda centrifugación.

9. Procedimiento de la prueba

Se recomienda el uso de un pipetador de repetición para los siguientes reactivos:

- Epi proColon Lysis Binding Buffer
- Epi proColon Magnetic Bead Suspension
- Ethanol en el paso 9.2.3.
- Epi proColon Wash A Buffer
- Epi proColon Wash B Buffer
- Epi proColon Elution Buffer
- Epi proColon Bisulfite Solution
- Epi proColon Protection Buffer y
- PCR Master Mix

Además recomendamos encarecidamente el uso de un agitador de noria y no un agitador de plataforma horizontal y pipetear el ADN extraído y tratado con bisulfito con pipetas de precisión.

9.1. Preparación de las soluciones activas

9.1.1. Preparación del tampón de lavado Epi proColon Wash A Buffer

- Añadir 60,0 ml de etanol absoluto (para biología molecular, ≥99,5 %) al Epi proColon Wash A Concentrate usando un cilindro estéril graduado o una pipeta serológica.
- Cerrar la tapa, mezclar bien invirtiendo el frasco cinco veces, evitar la formación de espuma. Etiquetar el frasco poniendo la fecha de dilución y marcar la casilla "Ethanol added".
- Almacenar el tampón Epi proColon Wash A Buffer reconstituido a una temperatura entre 15 y 30 °C durante un máximo de 6 semanas.

9.1.2. Preparación del tampón de lavado Epi proColon Wash B Buffer

- Añadir 40,0 ml de etanol absoluto (para biología molecular, ≥99,5 %) al Epi proColon Wash B Concentrate usando un cilindro estéril graduado o una pipeta serológica.
- Cerrar la tapa y mezclar bien invirtiendo el frasco cinco veces. Etiquetar el frasco poniendo la fecha de dilución y marcar la casilla "Ethanol added".
- Almacenar el tampón Epi proColon Wash B Buffer reconstituido a una temperatura entre 15 y 30 °C durante un máximo de 6 semanas.

9.2. Extracción del ADN y conversión bisulfito del plasma de los pacientes

Epi proColon 2.0 CE contiene reactivos suficientes para procesar un máximo de 32 muestras, incluyendo los controles. Incluir un control Epi proColon positivo y un control Epi proColon negativo en cada ensayo independiente. Al haber 4 tubos monouso de Epi proColon Bisulfite Solution se recomienda realizar 4 ensayos independientes (p. ej. 4 ensayos de 8 muestras cada uno).

Nota: Una breve centrifugación de los microtubos (señalada en el texto como "Centrifugar brevemente el tubo") es requerida en varios pasos de estas instrucciones con el fin de retirar las gotas de la tapa o de recoger el líquido residual. Se recomienda centrifugar durante 10 - 20 segundos a 1,000 ± 150 fcr usando

una centrífuga de mesa. Evitar centrifugar a mayor velocidad para prevenir la formación de grumos de partículas magnéticas en algunos pasos.

Nota: La agitación con vórtex de los tubos y de los recipientes es requerida en algunos pasos de estas instrucciones para asegurar una mezcla homogénea de los líquidos. Se recomienda el uso de un vórtex a velocidad media durante 5 - 10 segundos.

9.2.1. Descongelación del plasma y de los controles positivo y negativo Epi proColon

- Descongelar un Epi proColon Positive Control y un Epi proColon Negative Control durante aprox. 30 minutos a una temperatura entre 15 y 30 °C.
- Si se usan muestras de plasma congeladas, descongelar las muestras durante aprox. 30 minutos a una temperatura entre 15 y 30 °C.
- Iniciar la lisis dentro de los 60 minutos posteriores a la descongelación.

9.2.2. Lisis

Nota: Antes del uso, agitar brevemente el tampón Epi proColon Lysis Binding Buffer y controlar visualmente si hay precipitado. Si hay precipitado, calentar el Epi proColon Lysis Binding Buffer en un baño de agua a 37 °C durante 60 minutos y agitar suavemente hasta que el precipitado vuelva a disolverse completamente. Dejar queel tampón Epi proColon Lysis Binding Buffer alcance la temperatura ambiente antes del uso.

- Añadir lo que se indica a continuación a un tubo de centrifuga de 15 ml etiquetado:
    - 3,5 ml de la muestra de plasma o Epi proColon Positive Control o Epi proColon Negative Control
    - 3,5 ml de Epi proColon Lysis Binding Buffer
- Cerrar el tubo y mezclar con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Incubar el tubo en la mesa de trabajo a 15 - 30 °C durante 10 ± 1 min.

9.2.3. Fijación del ADN

Nota: Para que el resultado sea correcto, es esencial que la suspensión de partículas en Epi proColon Magnetic Beads sea homogénea. Diferencias en la cantidad especificada de partículas ("beads") pueden dar resultados erróneos. Para garantizar que la concentración de las partículas magnéticas sea correcta se deberá mezclar el frasco muy bien poco antes de pipetear hasta que no quede sedimento visible en el fondo. Garantizar también que la suspensión entre los pasos de pipeteo sea homogénea.

- Añadir al tubo de centrifuga de 15 ml en el siguiente orden:
    - 90 µl de Epi proColon Magnetic Beads (recién resuspendida)
    - 2,5 ml de etanol absoluto (para biología molecular, ≥99,5 %)
- Cerrar el tubo y mezclar invirtiéndolo 5 o 6 veces.
- Colocar el tubo de 15 ml en un agitador de rotación.
- Agitar a temperatura ambiente durante 45 ± 5 minutos a velocidad media (aprox. 10 - 20 rpm). Ajustar el ángulo del agitador a aprox. 35 - 45 grados.

9.2.4. Lavado del ADN

Nota: Antes de comenzar el lavado, ajustar el termoagitador a 80 ± 2 °C para su uso posterior en la elución y en la conversión bisulfito.

- Colocar el tubo de 15 ml en las gradillas magnéticas DynaMag™-15 durante 5 - 10 minutos.
- Desechar el sobrenadante con cuidado. Poner cuidado en no eliminar partículas magnéticas.
    - Añadir 1,5 ml de tampón Epi proColon Wash A Buffer
- Resuspender completamente las partículas magnéticas con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Transferir la suspensión de partículas magnéticas a un microtubo de 2,0 ml etiquetado, usando una pipeta de transferencia desechable de longitud extra (22,5 cm).

- Volver a introducir la pipeta de transferencia desechable dentro del tubo de 15 ml para recoger las partículas magnéticas restantes y transferirlas a un microtubo de 2,0 ml.
- Colocar el tubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 minutos.
- Retirar la mayor cantidad de tampón posible con una pipeta de transferencia desechable de 15 cm estando el tubo todavía en las gradillas magnéticas DynaMag™-2. Poner cuidado en no eliminar partículas magnéticas.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el microtubo de 2,0 ml en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 minutos.
- Quitar la mayor cantidad de tampón residual posible usando una pipeta de precisión de 10 - 100 µl estando el tubo aún en la gradilla magnética.

9.2.5. **Elución**

- Transferir el microtubo a una gradilla no magnética.
- Mezclar el tampón Epi proColon Elution Buffer con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Añadir 100 µl de Epi proColon Elution Buffer en cada tubo.
- Cerrar el tubo.
- Resuspender nuevamente las partículas magnéticas con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Colocar el microtubo en un termoagitador ajustado a 1,000 ± 100 rpm e incubar a 80 ± 2 °C durante10 ± 1 min.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el microtubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 minutos.
- Con el tubo en la gradilla magnética, transferir todo el eluato (~100 µl de solución de ADN) a un microtubo nuevo de 2,0 ml.
- Desechar el microtubo de 2 ml que contiene las partículas magnéticas.

9.2.6. **Almacenamiento del ADN extraído**

Nota: Si no va a ser utilizado inmediatamente el ADN extraído, almacenar el material entre 2 y 8 °C durante un máximo de 24 horas. **No congelar** el ADN extraído.

9.2.7. **Conversión bisulfito**

Nota: Epi proColon Bisulfite Solution es sensible al oxígeno. Usar únicamente tubos de Epi proColon Bisulfite Solution que no estén abiertos. No almacenar. Desechar cualquier resto de la solución.

- Añadir los siguientes reactivos a los microtubos de 2,0 ml que contienen el eluato (~100 µl de solución de ADN):
  - 150 µl de Epi proColon Bisulfite Solution
  - 25 µl de Epi proColon Protection Buffer
- Cerrar el tubo y mezclar la reacción bisulfito con un vórtex durante 5-10 segundos.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el tubo en el termoagitador e incubar durante 45 ± 5 minutos a 80 ± 2 °C **sin** agitar.
- Retirar el tubo del termoagitador después de transcurrir 45 ± 5 min.
- Ajustar la temperatura del termoagitador a 23 ± 2 °C o preparar un segundo termoagitador a 23 ± 2 °C para uso posterior.

9.2.8. **Fijación**

Nota: Para que el resultado sea correcto, es esencial que la suspensión Epi proColon Magnetic Beads sea homogénea. Diferencias en la cantidad de partículas especificada pueden dar resultados erróneos. Para garantizar que la concentración de partículas magnéticas sea correcta hay que mezclar bien el frasco antes de pipetear hasta que no quede ningún resto de sedimentación en el fondo. Garantizar también que la suspensión entre los pasos de pipeteo sea homogénea.

- Centrifugar brevemente el microtubo de 2,0 ml con la reacción bisulfito.
- Añadir los siguientes componentes al microtubo:
    - 1000 µl de Epi proColon Wash A Buffer
    - 20 µl de Epi proColon Magnetic Beads (recién suspendidas).
- Mezclar con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Esperar a que el termoagitador alcance los 23 ± 2 °C.
- Colocar el microtubo en el termoagitador a 1000 ± 100 rpm e incubar durante 45 ± 5 minutos a 23 ± 2 °C.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el tubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 – 6 minutos.
- Retirar la mayor cantidad posible de líquido con una pipeta de transferencia desechable nueva de 15 cm con el tubo en la gradilla magnética. Poner cuidado en no eliminar partículas magnéticas.

9.2.9. **Primer lavado**

- Separar la gradilla con las muestra del campo magnético para realizar el lavado y la agitación convórtex, añadir:
    - 800 µl de Epi proColon Wash A Buffer.
- Resuspender con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el tubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 min.
- Retirar la mayor cantidad posible de líquido con una pipeta de transferencia desechable nueva de 15 cm con el tubo en la gradilla magnética. Poner cuidado en no eliminar partículas magnéticas.

9.2.10. **Segundo lavado**

- Separar la gradilla con las muestra del campo magnético para realizar el lavado y la agitación convórtex, añadir:
    - 800 µl de Epi proColon Wash B Buffer.
- Resuspender con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el tubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 min.
- Retirar la mayor cantidad posible de líquido con una pipeta de transferencia desechable nueva de 15 cm con el tubo en la gradilla magnética. Poner cuidado en no eliminar partículas magnéticas.

9.2.11. **Tercer lavado**

- Separar la gradilla con las muestra del campo magnético para realizar el lavado y la agitación convórtex, añadir:
    - 400 µl de Epi proColon Wash B Buffer.
- Resuspender con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el tubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 min.
- Retirar la mayor cantidad posible de líquido con una pipeta de transferencia desechable nueva de 15 cm con el tubo en la gradilla magnética. Poner cuidado en no eliminar partículas magnéticas.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el tubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 min.
- Quitar la mayor cantidad de líquido residual posible usando una pipeta de precisión de 10 - 100 µl con el tubo en la gradilla magnética. Poner cuidado en no eliminar partículas magnéticas.

9.2.12. Secado

Nota: No aumentar el tiempo de secado ni la temperatura. Un secado excesivo puede terminar reduciendo la cantidad de bisDNA.

- Abrir la tapa del microtubo.
- Colocar el tubo abierto en el termoagitador.
- Dejar que se seque durante 10 ± 1 minutos a 23 ± 2 °C sin agitar.

9.2.13. Elución

- Transferir el microtubo a una gradilla no magnética y añadir:
    - o 60 µl de Epi proColon Elution Buffer.
- Cerrar el tubo.
- Reuspender las partículas magnéticas con el vórtex durante 5-10 segundos.
- Incubar durante 10 ± 1 minutos a 23 ± 2 °C en un termoagitador a 1000 ± 100 rpm.
- Centrifugar brevemente el tubo.
- Colocar el tubo en las gradillas magnéticas DynaMag™-2 durante 2 - 6 min.
- Transferir todo el eluato (~ 60 µl de solución de ADN) a una placa de 96 pocillos usando una pipeta de precisión de 10 - 100 µl y sellar la placa con un film adhesivo empleando un aplicador especial.
- Preparar la placa de almacenamiento del bisDNA con arreglo a la Tabla 4.

Tabla 4: Disposición recomendada para una placa de bisDNA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC[#]	S7										
B	NC[$]	S8										
C	S1	S9										
D	S2	S10										
E	S3	S11										
F	S4	S12										
G	S5	S13										
H	S6	S14										

[#]Control Epi proColon Positive, [$]Control Epi proColon Negative

9.2.14. Almacenamiento de ADN con conversión bisulfito

Si el ADN extraído y convertido por bisulfito no se usa inmediatamente, almacenar el material a 2 - 8 °C durante un máximo de 24 horas o a entre -25 y -15 °C durante un máximo de 72 horas.

9.3. Preparación de la PCR

Nota: Cada muestra de ADN con conversión bisulfito (bisDNA) (muestra del paciente, control Epi proColon Positive o control Epi proColon Negative) la prueba se realizará por triplicado.

Nota: Antes del uso centrifugar Epi proColon Polymerase durante 10 - 20 segundos a 1000 ± 150 fcr usando una centrífuga de mesa para eliminar las gotas de la tapa.

9.3.1. Preparación de la PCR Master Mix

- Descongelar 1 o 2 tubos de Epi proColon PCR Mix dependiendo del número de análisis de muestras de pacientes y controles que se deseen realizar (véase Tabla 5).
- Agitar con el vórtex el/los tubo(s) de Epi proColon PCR Mix durante –5-10 segundos; centrifugar el/los tubo(s) brevemente.

- Transferir el volumen correspondiente de Epi proColon PCR Mix y Epi proColon Polymerase como figura en la Tabla 5 a un microtubo de 2,0 ml.
- Mezclar con el vórtex el PCR Master Mix durante 5-10 segundos.
- Centrifugar brevemente el PCR Master Mix para eliminar las gotas de la tapa.

Nota: Usar el PCR Master Mix inmediatamente, no almacenar. Volver a congelar el Epi proColon PCR Mix y el Epi proColon Polymerase sobrante inmediatamente después de su uso.

Nota: Para cada PCR se requieren 16 µl de Epi proColon PCR Mix y 0,8 µl de Epi proColon Polymerase. Volúmenes indicados ya incluyen márgenes de pipeta. No es requerido de preparar reacción adicional para la preparación del Master Mix.

Tabla 5: Preparación de PCR Master Mix incluyendo márgenes de pipeta.

Componente	Volumen para 8 determinaciones (24 PCRs)	Volumen para 16 determinaciones (48 PCRs)	Volumen para 24 determinaciones (72 PCRs)	Volumen para 32 determinaciones (96 PCRs)
Epi proColon PCR Mix	384 µl	768 µl	1152 µl	1536 µl
Epi proColon Polymerase	19,2 µl	38,4 µl	57,6 µl	76,8 µl

Tabla 6: Disposición de placa PCR recomendada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC#	PC#	PC#	S7	S7	S7						
B	NC$	NC$	NC$	S8	S8	S8						
C	S1	S1	S1	S9	S9	S9						
D	S2	S2	S2	S10	S10	S10						
E	S3	S3	S3	S11	S11	S11						
F	S4	S4	S4	S12	S12	S12						
G	S5	S5	S5	S13	S13	S13						
H	S6	S6	S6	S14	S14	S14						

#Control Epi proColon Positive, $Control Epi proColon Negative

Nota: Si la PCR se realiza con los instrumentos 7500 Fast PCR o 7500 Fast Dx PCR Applied Biosystems con SDS v1.4, seguir las instrucciones del apartado 10 y del apartado 13.

Si la PCR se realiza con el instrumento I Roche LightCycler 480, seguir las instrucciones del Apartado 11 y del Apartado 13.

Si la PCR se realiza con el instrumento II Roche LightCycler 480, seguir las instrucciones del Apartado 12 y del Apartado 13.

10. Análisis con los instrumentos PCR 7500 Fast y 7500 Fast Dx de Applied Biosystems

10.1. Software requerido

Este producto ha sido validado usando el software SDS v1.4 con el módulo 21 CFR Part 11.

10.2. Preparación de la placa PCR (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems)

- Preparar la placa PCR. Se recomienda la disposición de placas que figura en la Tabla 6.

- Transferir 15 µl de PCR Master Mix en los pocillos seleccionados de la placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp® Fast Optical.
- Si se requiere, centrifugar brevemente la placa de almacenamiento de bisDNA creada en el Apartado 9.2.13 a 1000 ± 100 fcr usando la centrífuga para placas.
- Añadir 15 µl de solución de bisDNA en los pocillos correspondientes de la placa PCR.
- Sellar la placa con film adhesivo óptico MicroAmp®.
- Centrifugar brevemente la placa con una centrífuga para placas durante 1 minuto a 1000 ± 100 fcr.

Nota: La placa PCR cargada puede ser almacenada en un frigorífico a 2 - 8 °C durante un máximo de 4 horas.

10.3. **Carga de la placa (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems)**

Nota: El PCR Master Mix no contiene ROX ni otros colorantes de referencia. Por esta razón el ajuste de la referencia pasiva debe ser "none".

Nota: Se recomienda guardar un archivo de plantilla (*.sdt) con las configuraciones de ciclos y análisis PCR.

- Iniciar el software, versión SDS v1.4.
- Cargar el archivo de plantilla específico del experimento o crear un nuevo documento de placa.
- Hacer clic sobre "Create New Document".
- Definir estos ajustes para el documento de placa:
  - Assay: Standard Curve (cuantificación absoluta)
  - Container: 96-Well Clear
  - Template: Blank Document (o seleccionar el archivo de plantilla Epi proColon 2.0 CE correspondiente)
  - Run Mode: Standard 7500.
- Hacer clic sobre "Next".
- Hacer clic sobre "New Detector…".
- Crear un nuevo detector con estos ajustes:
  - Name: Septin9
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: FAM
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Red.
- Hacer clic sobre "Create Another" y definir estos ajustes:
  - Name: ACTB
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: JOE
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Green.
- Hacer clic en "ok".
- Seleccionar los dos detectores y hacer clic en "Add >>" para asignar los detectores al documento de placa.
- Seleccionar "(none)" en el menú desplegable "Passive Reference".
- Hacer clic en "Done".
- Ir al menú "Setup" y "Plate".
- Seleccionar los 96 pocillos de la placa.
- Ir al submenú "View" y abrir el "Well Inspector".
- Seleccionar el detector "Septin9" y "ACTB".

- Comprobar que "Passive Reference" está configurado en “(none)” (véase Figura 1).
- Hacer clic en “Close”.
- Ir al menú “Instrument” para ajustar el programa PCR como se describe en la Tabla 7.
- Cambiar estos ajustes:
    - Sample Volume: 30 µl,
    - Run Mode: Standard 7500,
    - Data Collection: Stage 2, Step 2.
- Crear un “Thermal Profile” con 3 estadios ("stages").
- Crear un “Stage 2” con 3 pasos (steps) y un “Stage 1” y “Stage 3” con 1 paso cada uno.
- Introducir las repeticiones (repetitions), la temperatura final (target) y el tiempo de espera (hold) según se indica en la Tabla 7
- Cambiar la velocidad de calentamiento (“Ramp Rate”) según se indica en la Tabla 7.
- Configurar el parámetro “Data Collection” para “Stage 2, Step 2" en "(55.5 @ 0:35)”.
- Comprobar los ajustes del Thermal Cycler Protocol en base a la Tabla 7 (véase la Figura 2).
- Guardar el documento de plantilla bajo un nombre de archivo apropiado.
- Abrir la bandeja del instrumento.
- Colocar la placa PCR en el soporte (posición A1 se encuentra en el ángulo superior izquierdo), comprobar que la placa esté bien colocada en el soporte. Cerrar la bandeja.
- Hacer clic en “Start” para iniciar la ejecución.

Tabla 7: Programa Thermal Cycler para 7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems.

Parámetros del programa	**Desnaturalización**	**Ciclos**			**Enfriamiento**
Estadio	”Stage 1”	”Stage 2”			”Stage 3”
Repeticiones (Repetitions)	1	45			1
Paso (Step)	1	1	2	3	1
Temperatura final (Target) [°C]	94	62	55,5	93	40
Duración (Hold) [mm:ss]	20:00	0:05	0:35	0:30	0:05
Incremento automático (Auto Increment)		0	0	0	
Velocidad de calentamiento (Ramp Rate) [%]	40	80	80	40	80
Recogida de datos (Data Collection)	Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)				

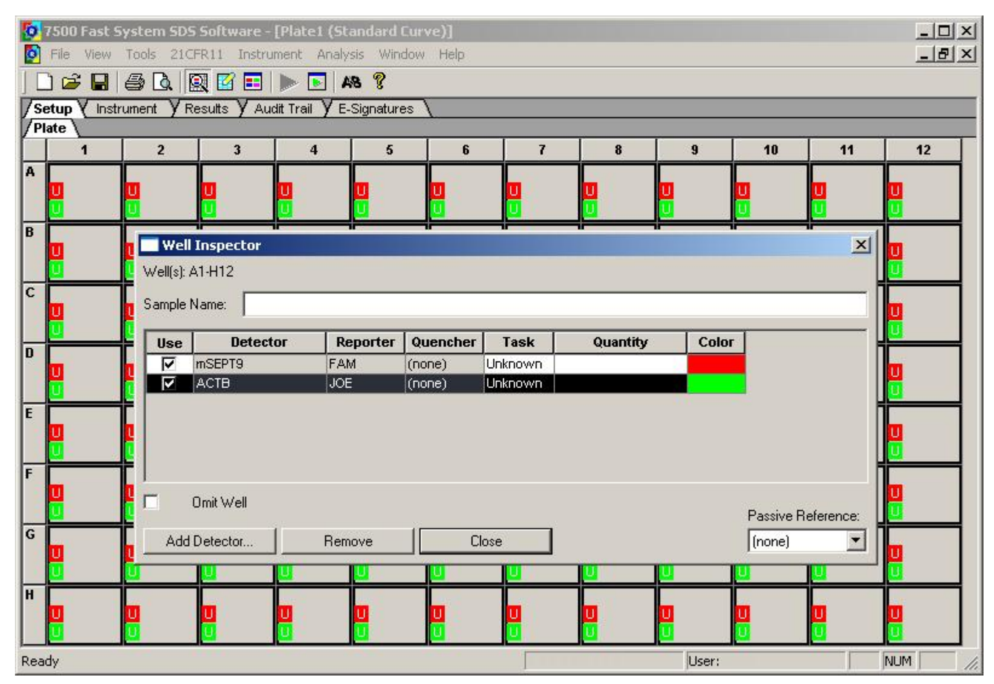


Figura 1: Captura de pantalla del software SDS v1.4 después de confirmar las configuraciones en la ventana "Well Inspector".

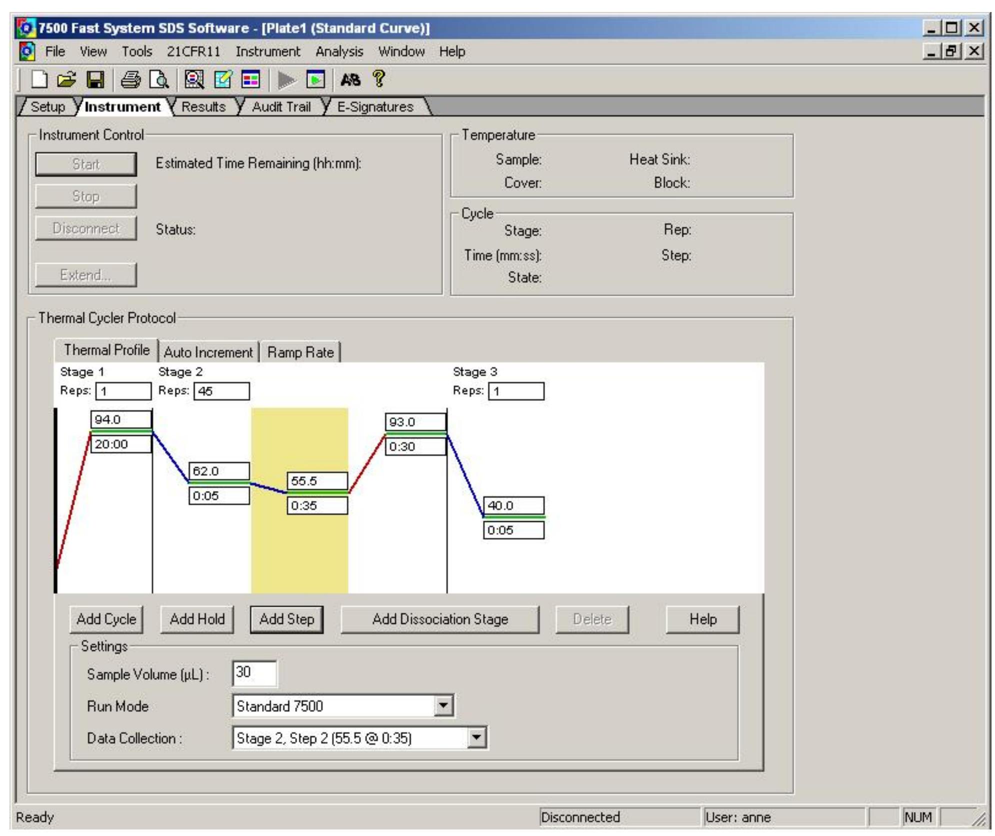


Figura 2: Captura de pantalla del software SDS v1.4 tras crear el programa PCR.

10.4. **Análisis de resultados (7500 Fast / Fast Dx de Applied Biosystems)**

Nota: Analizar los resultados PCR sólo con la versión del software SDS v1.4.

Nota: Ejecuciones incompletas o ejecuciones en las cuales se produce un mensaje de error no se deben analizar. El documento de ejecución debe contener los datos de fluorescencia durante 45 ciclos.

- Después de completar el ciclo PCR hacer clic en “ok”.
- Abrir el menú “Results” y seleccionar “Amplification Plot“.
- Configurar “Analysis Setting” del detector Septin9 de la siguiente manera:
  - Data: “Delta Rn vs Cycle”
  - Detector: “Septin9”
  - Line color: “Detector Color”
  - Manual Ct, Threshold: “50000” (aparece como “5.0e+004”)
  - Manual baseline, Start (cycle): “10”
  - Manual baseline, End (cycle): “22”
- Definir “Analysis Setting” del detector ACTB:
  - Data: “Delta Rn vs Cycle”
  - Detector: “ACTB”
  - Line color: “Detector Color”
  - Manual Ct, Threshold: “25000” (aparece como “2.5e+004”)
  - Manual baseline, Start (cycle): “10”
  - Manual baseline, End (cycle): “22”
- Hacer clic en “Analyze”.
- Hacer clic en “Save”.
- El cálculo de los valores de Septin9 Ct y de ACTB Ct es automático.
- Seleccionar los pocillos para el análisis.
- Las curvas de amplificación se muestran en el menú “Amplification Plot”.
- Los valores Ct aparecen en “Report”.

Nota: Comprobar visualmente todas las curvas de amplificación. Las curvas de amplificación con puntos incoherentes más allá del umbral (picos del ruido) o de forma lineal se deberían considerar negativas. Véase la Figura 3.

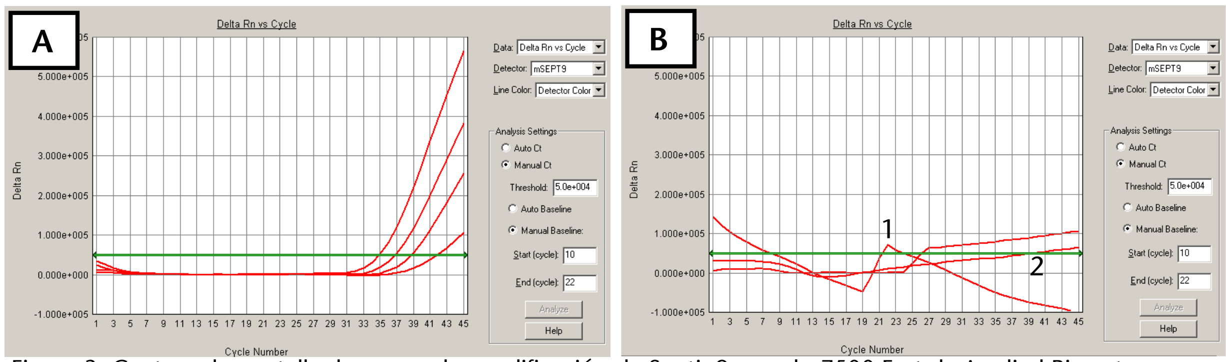


Figura 3: Captura de pantalla de curvas de amplificación de Septin9 usando 7500 Fast de Applied Biosystems.
A: Ejemplos de curvas válidas. B: Ejemplos de curvas negativas debido a la incoherencia de los puntos (1) o a una forma lineal (2).

10.5. **Validez de la prueba confirmada con controles Epi proColon (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems)**

Cualquier ensayo (muestras de paciente procesadas junto con los controles Epi proColon Positive y Epi proColon Negative) se considera válido si los criterios indicados en la Tabla 8 se cumplen para **LAS TRES (3)** réplicas de PCR por control.

Si el control Epi proColon Positive o Epi proColon Negative (o ambos) no es válido, los datos de las muestras de paciente procesadas junto con los controles no pueden ser interpretados. Esta comprobación hay que repetirla para todas las muestras de pacientes del ensayo.

Tabla 8: Criterios de validez de los controles Epi proColon analizados con 7500 Fast / 7500 Fast Dx de Applied Biosystems.

Resultado del control	Determinación	Resultado Septin9	Resultado ACTB
Positive Control valid	PCR1 PCR2 PCR3	Ct* ≤ 41,1 Ct* ≤ 41,1 Ct* ≤ 41,1	Ct* ≤ 29,8 Ct* ≤ 29,8 Ct* ≤ 29,8
Negative Control valid	PCR1 PCR2 PCR3	Ct* no disponible (“Undetermined”)	Ct* ≤ 37,2 Ct* ≤ 37,2 Ct* ≤ 37,2

*Cycle threshold (umbral del ciclo)

10.6. Interpretación de los resultados para una PCR única (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems)

La interpretación de una PCR única se efectúa según se indica en la Tabla 9. Si el resultado del control interno de ACTB indica que la cantidad de ADN que entra en la prueba PCR individual es suficiente (umbral de ciclo ACTB especificado en la Tabla 9), el resultado de PCR Septin9 define el resultado de la PCR individual (véase el Apartado 13). Un valor ACTB superior al umbral de ciclo especificado en la Tabla 9 define el resultado de la PCR individual como “Invalid PCR”.

Tabla 9: Interpretación de los resultados de la PCR individual (7500 Fast / Fast Dx Applied Biosystems).

Resultado PCR individual	Resultado Septin9	Resultado ACTB
Septin9 Positivo	Ct* < 45	Ct* ≤ 32,1
Septin9 Negativo	Ct* no disponible (“Undetermined”)	Ct* ≤ 32,1
Invalid	Cualquier resultado	Ct* > 32,1 O ”Undetermined”

*Cycle threshold (umbral del ciclo)

11. Análisis con el Instrumento I de Roche LightCycler 480

11.1. Preparación de la placa (Instrumento I LightCycler 480)

- Preparar la placa PCR. Se recomienda la disposición de placas que figura en la Tabla 6.
- Transferir 15 µl de PCR Master Mix en los pocillos seleccionados de la placa de reacción LightCycler 480 Multiwell Plate 96.
- Centrifugar brevemente la placa de almacenamiento de bisDNA creada en el Apartado 9.2.13 durante 1 minuto a 1000 ± 100 fcr usando la centrífuga para placas.
- Añadir 15 µl de solución de bisDNA en los pocillos correspondientes de la placa PCR.
- Sellar la placa PCR con film de sellado LightCycler 480.
- Centrifugar brevemente la placa PCR con una centrífuga para placas durante 1 minuto a 1000 ± 100 fcr.

Nota: La placa PCR cargada puede ser almacenada a 2 - 8 °C durante un máximo de 4 horas.

11.2. Carga de la placa (Instrumento I LightCycler 480)

Nota: Se recomienda guardar las configuraciones de ciclo y de análisis en un archivo de plantilla (*.ixo).

- Iniciar el software versión 1.5.x.
- Crear un nuevo experimento, hacer clic en “New Experiment”

- Cargar el archivo de plantilla del experimento especificado o definir el siguiente experimento en base a los parámetros del programa PCR de la Tabla 10.
- Abrir la bandeja del instrumento.
- Colocar la placa PCR en el soporte (la posición A1 se encuentra en el ángulo superior izquierdo); comprobar que la placa esté bien colocada en el soporte. Cerrar la bandeja.
- Hacer clic en "Start Run" para iniciar.

Tabla 10: Programa PCR estándar para el instrumento I de LightCycler 480.

Parámetros del programa	Desnaturalización	Ciclos			Enfriamiento
Modo de análisis	None	Quantification mode			None
Ciclos	1	50			1
Segmento	1	**1**	**2**	**3**	1
Temperatura final (Target) [°C]	94	62	56	93	40
Duración (Hold) [hh:mm:ss]	0:20:00	0:00:05	0:00:35	0:00:30	0:00:30
Velocidad de calentamiento (Ramp Rate) [°C/s]*	1,0	1,3	1,3	1,3	1,3
Modo de detección	None	None	Single	None	None

* Instrumento I de LightCycler 480: seleccionar el formato de detección "Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe", activar la combinación de filtro 483 – 533 nm y 523 – 568 nm y ajustar "Reaction Volume" en "30".

11.3. Análisis de los resultados (Instrumento I de LightCycler 480)

Nota: Los usuarios del instrumento I de LightCycler 480 deben seleccionar *Color Compensation* "ON" y cargar el correspondiente archivo "Epi proColon Color Compensation" para la combinación de filtros "Filter Comb 483 - 533" y "Filter Comb 523 - 568".

Nota: Ejecutar el análisis de los datos exclusivamente en pocillos usados, es decir, generando un "sample sub set" como se describe en el manual de usuario del instrumento I de LightCycler® 480.

- Hacer clic en "Analysis" en el LightCycler® 480 Basic Software para abrir la ventana "Analysis Overview".
- Seleccionar "Abs Quant/Fit Points" para todas las muestras.
- Activar la "Epi proColon Color Compensation".
- Activar la combinación de filtros "Filter Comb 483 - 533".
- Configurar el primer ciclo "First Cycle" en "1" y el último "Last Cycle" en"50".
- Configurar el fondo en "5 - 22" (hacer clic en el botón azul "background"), ajustando "Min Offset" en "4" y "Max Offset" en "21" en la ventana "Cycle Range".
- En la ventana "Noise Band", configurar la compensación del fondo en "Noise Band (Fluoresc)" y ajustar el valor límite en "1.6".
- En la ventana "Analysis", configurar el valor límite "Threshold (Manual)" en "1.6".
- En la ventana "Analysis", ajustar el número de los Fit Points en "2".
- Hacer clic en "Calculate".

  El **Septin9 Crossing Point ("CP")** se calcula automáticamente para cada muestra y se visualiza en la tabla de resultados.
- Exportar los valores CP haciendo clic en la tabla de resultados con el botón derecho del ratón. Seleccionar "Export". Guardar el archivo bajo un nombre apropiado.

- Activar la combinación de filtros "Filter Comb 523 - 568".
- Configurar el primer ciclo "First Cycle" en "1" y el último "Last Cycle" en"50".
- Definir el fondo (haciendo clic sobre el botón azul "Background") en "5-22", configurando "Min Offset" en "4" y "Max Offset" en "21" en la ventana "Cycle Range".
- En la ventana "Noise Band", configurar la compensación del fondo en "Noise Band (Fluoresc)" y ajustar el valor límite en "0.8".
- En la ventana "Analysis", configurar el valor límite "Threshold (Manual)" en "0.8".
- En la ventana "Analysis", ajustar el número de los Fit Points en "2".
- Hacer clic en "Calculate".

  Los **valores ACTB CP** de cada muestra se calculan automáticamente y se muestran en la tabla de resultados.
- Exportar los valores CP haciendo clic en la tabla de resultados con el botón derecho del ratón. Seleccionar "Export". Guardar el archivo bajo un nombre apropiado.

Nota: Configurar "Noise Band" y "Threshold" de modo que el valor se encuentre ligeramente por encima del fondo y cruce las curvas de amplificación al inicio del incremento exponencial de la PCR. Si hay curvas de amplificación sin un incremento exponencial claro se considerarán negativas.

11.4. Validez de la prueba confirmada con los controles Epi proColon (instrumento I de LightCycler 480)

Cualquier ensayo (muestras de pacientes procesadas junto con los controles Epi proColon Positive y Epi proColon Negative) se considera válido si los criterios indicados en la Tabla 11 se cumplen para **LAS TRES (3)** réplicas de PCR por control.

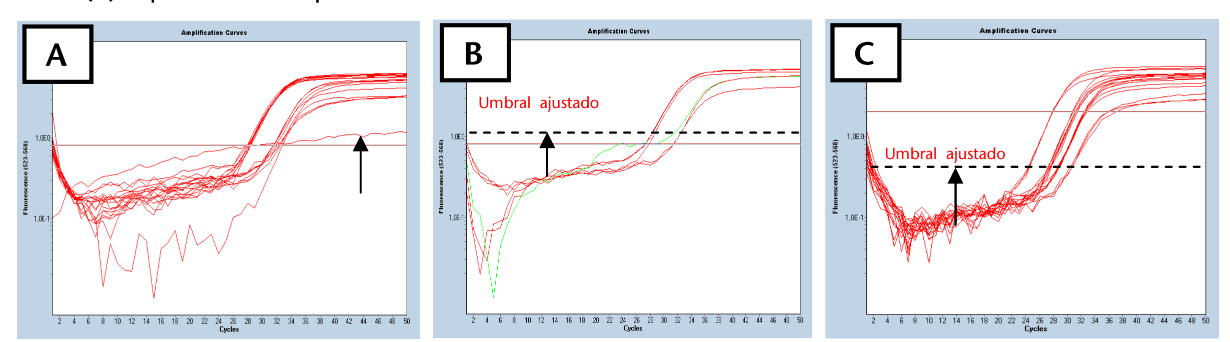


Figura 4: Captura de pantalla de curvas de amplificación de Septin9 usando LightCycler 480. A: Una curva de amplificación sin un incremento exponencial claro se considerará negativa. B: Configurar el umbral ("Threshold") de modo que éste sea ligeramente superior al fondo. C: Configurar el umbral ("Threshold") de modo que cruce las curvas de amplificación al inicio del incremento exponencial de PCR.

Si el control Epi proColon Positive o Epi proColon Negative (o ambos) no es válido, los datos de las muestras de paciente procesadas junto con los controles no pueden ser interpretados. Esta comprobación hay que repetirla para todas las muestras de pacientes del ensayo.

Tabla 11: Criterios de validez de los controles Epi proColon (Instrumento I de LightCycler 480).

Resultado del control	Determinación	Resultado Septin9	Resultado ACTB
Positive Control valid	**PCR1**	CP* ≤ 40,6	CP* ≤ 29,5
	PCR2	CP* ≤ 40,6	CP* ≤ 29,5
	PCR3	CP* ≤ 40,6	CP* ≤ 29,5
Negative Control valid	PCR1	CP* no disponible	CP* ≤ 36,5
	PCR2		CP* ≤ 36,5
	PCR3		CP* ≤ 36,5

*Crossing Point (punto de intersección)

11.5. **Interpretación de los resultados de una PCR individual (Instrumento I LightCycler 480)**

Si el resultado del control interno de ACTB indica que la cantidad de ADN que entra en la prueba PCR individual es suficiente (umbral de ciclo ACTB especificado en la Tabla 12), el resultado de PCR Septin9 define el resultado de dicha PCR individual (véase el Apartado 13). Un valor de ACTB superior al punto de intersección especificado en la Tabla 12 provoca que un resultado PCR individual sea “invalid”.

Tabla 12: Interpretación de los resultados de una PCR individual (instrumento I LightCycler 480).

Resultado PCR individual	Resultado Septin9	Resultado ACTB
Septin9 Positivo	CP* < 50	CP* ≤ 33,1
Septin9 Negativo	CP* no disponible	CP* ≤ 33,1
Invalid	Cualquier resultado	CP* > 33,1

*Crossing Point (punto de intersección)

12. Análisis con el instrumento II de Roche LightCycler 480

12.1. **Preparación de la placa (instrumento II de LightCycler 480)**

- Preparar la placa PCR. Se recomienda la disposición de placas que figura en la Tabla 6.
- Transferir 15 µl de PCR Master Mix en los pocillos seleccionados de una placa de reacción LightCycler 480 Multiwell Plate 96.
- Centrifugar brevemente la placa de almacenamiento de bisDNA creada en el Apartado 9.2.13 durante 1 minuto a1000 ± 100 fcr usando la centrífuga para placas.
- Añadir 15 µl de solución de bisDNA en los pocillos correspondientes de la placa PCR.
- Sellar la placa PCR con film de sellado LightCycler 480.
- Centrifugar brevemente la placa PCR con una centrífuga para placas durante 1 minuto a 1000 ± 100 fcr.

Nota: La placa PCR cargada puede ser almacenada en un frigorífico a 2 - 8 °C durante un máximo de 4 horas.

12.2. **Carga de la placa (instrumento II de LightCycler 480)**

Nota: Se recomienda guardar las configuraciones de ciclo y de análisis en un archivo de plantilla (*.ixo).

- Iniciar el software versión 1.5.x.
- Para crear un nuevo experimento, hacer clic en “New Experiment”
- Cargar el archivo de plantilla del experimento especificado o definir el siguiente experimento en base a los parámetros del programa PCR de la Tabla 13.
- Abrir la bandeja.
- Colocar la placa PCR en el soporte (la posición A1 se encuentra en el ángulo superior izquierdo); comprobar que la placa esté bien colocada en el soporte. Cerrar la bandeja.
- Hacer clic en “Start Run” para iniciar.

Tabla 13: Programa estándar PCR para el instrumento II LightCycler 480.

Parámetros del programa	**Desnaturalización**	**Ciclos**			**Enfriamiento**
Modo de análisis	None	Quantification mode			None
Ciclos	1	50			1
Segmento	1	**1**	**2**	**3**	1
Temperatura final (Target) [°C]	94	62	56	93	40
Duración (Hold) [hh:mm:ss]	0:20:00	0:00:05	0:00:35	0:00:30	0:00:30
Velocidad de calentamiento (Ramp Rate) [°C/s]*	1,0	1,3	1,3	1,3	1,3
Modo de detección	None	None	Single	None	None

* Instrumento II de LightCycler 480: seleccionar el formato de detección “Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”, activar la combinación de filtro 465 – 510 nm y 533 – 580 nm y ajustar “Reaction Volume” en “30”.

12.3. Análisis de los resultados (instrumento II de LightCycler 480)

Nota: Ejecutar el análisis de los datos exclusivamente en pocillos ocupados, es decir, definiendo un “sample sub set” como se describe en el manual del instrumento II de LightCycler® 480.

- Hacer clic en “Analysis” en el LightCycler® 480 Basic Software para abrir la ventana “Analysis Overview”.
- Seleccionar “Abs Quant/Fit Points” para todas las muestras.
- Activar la combinación de filtros “Filter Comb 465 - 510“.
- Configurar el primer ciclo “First Cycle” en “1” y el último “Last Cycle” en“50”.
- Configurar el fondo en “5 - 22” (hacer clic en el botón azul “background”), ajustando “Min Offset“ en “4“ y “Max Offset“ en “21“ en la ventana “Cycle Range”.
- En la ventana “Noise Band”, configurar la compensación del fondo en “Noise Band (Fluoresc)“ y ajustar el valor límite en "2.0“.
- En la ventana “Analysis“, configurar el valor límite “Threshold (Manual)” en “2.0“.
- En la ventana “Analysis“, ajustar el número de los Fit Points en “2“.
- Hacer clic en “Calculate”.

  El **Septin9 Crossing Point (“CP”)** se calcula automáticamente para cada muestra y se visualiza en la tabla de resultados.
- Exportar los valores CP haciendo clic en la tabla de resultados con el botón derecho del ratón. Seleccionar “Export”. Guardar el archivo bajo un nombre apropiado.
- Activar la combinación de filtros “Filter Comb 533 - 580“.
- Configurar el primer ciclo “First Cycle” en “1” y el último “Last Cycle” en“50”.
- Definir el fondo (haciendo clic sobre el botón azul "Background") en “5-22”, configurando “Min Offset“ en “4“ y “Max Offset“ en “21“ en la ventana “Cycle Range”.
- En la ventana “Noise Band”, configurar la compensación del fondo en “Noise Band (Fluoresc)“ y ajustar el valor límite en "2.0“.
- En la ventana “Analysis“, configurar el valor límite “Threshold (Manual)” en “2.0“.
- En la ventana “Analysis“, ajustar el número de los Fit Points en “2“.
- Hacer clic en “Calculate”.

Los **valores ACTB CP** de cada muestra se calculan automáticamente y se visualizan en la tabla de resultados.

- Exportar los valores CP haciendo clic en la tabla de resultados con el botón derecho del ratón. Seleccionar "Export". Guardar el archivo bajo un nombre apropiado.

Nota: Configurar "Noise Band" y "Threshold" de modo que el valor se encuentre ligeramente por encima del fondo y cruce las curvas de amplificación al inicio del incremento exponencial de la PCR. Si hay curvas de amplificación sin un incremento exponencial claro se considerarán negativas.

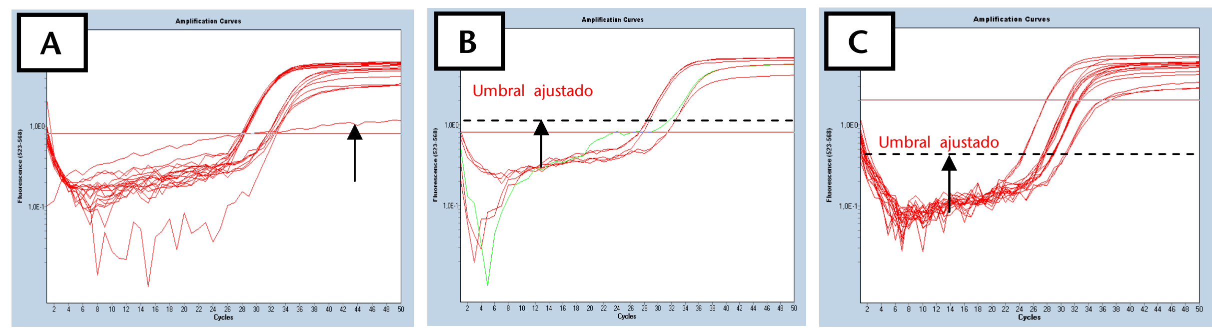


Figura 5: Capturas de pantalla de curvas de amplificación de Septin9 usando LightCycler 480 A: Una curva de amplificación sin un incremento exponencial claro se considerará negativa. B: Configurar el umbral ("Threshold") de modo que éste sea ligeramente superior al fondo. C: Configurar el umbral ("Threshold") de modo que cruce las curvas de amplificación al inicio del incremento exponencial de PCR.

12.4. Criterios de validez para los controles Epi proColon (instrumento II de LightCycler 480)

Cualquier ensayo (muestras de pacientes procesadas junto con los controles Epi proColon Positive y Epi proColon Negative) se considera válido si los criterios indicados en la Tabla 14 se cumplen para **LAS TRES (3)** réplicas de PCR por control.

Si el control Epi proColon Positive o Epi proColon Negative (o ambos) no es válido, los datos de las muestras de paciente procesadas junto con los controles no pueden ser interpretados. Esta comprobación hay que repetirla para todas las muestras de pacientes del ensayo.

Tabla 14: Criterios de validez de los controles Epi proColon (instrumento II de LightCycler 480).

Resultado del control	Determinación	Resultado Septin9	Resultado ACTB
Positive Control valid	PCR1 PCR2 PCR3	CP* ≤ 40,5 CP* ≤ 40,5 CP* ≤ 40,5	CP* ≤ 30,3 CP* ≤ 30,3 CP* ≤ 30,3
Negative Control valid	PCR1 PCR2 PCR3	CP* no disponible	CP* ≤ 37,1 CP* ≤ 37,1 CP* ≤ 37,1

*Crossing Point (punto de intersección)

12.5. Interpretación de los resultados de reacciones PCR individuales (instrumento II LightCycler 480)

Si el resultado del control interno de ACTB indica que la cantidad de ADN que entra en la prueba PCR individual es suficiente (umbral de ciclo ACTB especificado en la Tabla 15), el resultado de PCR Septin9 define el resultado de dicha PCR individual (véase el Apartado 13). Un valor ACTB superior al punto de intersección especificado en la Tabla 15 define el resultado PCR como "Invalid PCR".

Tabla 15: Interpretación de los resultados de reacciones PCR individuales (instrumento II de LightCycler 480).

Resultado PCR individual	Resultado Septin9	Resultado ACTB
Septin9 Positivo	CP* < 50	CP* ≤ 33,7
Septin9 Negativo	CP* no disponible	CP* ≤ 33,7
Invalid	Cualquier resultado	CP* > 33,7

* Crossing Point (punto de intersección)

13. Interpretación de los resultados de una muestra de paciente

El resultado de la prueba de una muestra de paciente se interpreta en base a la Tabla 16. El resultado de la prueba de una muestra del paciente es "POSITIVO" si al menos dos de tres réplicas de PCR dan positivo a Septin9. El resultado de la prueba de una muestra del paciente es "NEGATIVO" si al menos dos de tres réplicas de PCR dan negativo a Septin9. El resultado de la prueba es "INVALIDO" en todos los demás casos.

Tabla 16: Interpretación de los resultados de la prueba Epi proColon 2.0 CE.

Resultado de la prueba	Control positivo Control negativo	Resultados de la PCR individual
POSITIVE	Valid	Al menos dos PCR Septin9 positivas
NEGATIVE	Valid	Al menos dos PCR Septin9 negativas
INVALID	Valid	Todos los demás casos
INVALID	Invalid	n/c

14. Control de calidad

14.1. Controles externos

Epi proColon 2.0 CE incluye los controles Epi proColon Positive y Epi proColon Negative (M5-02-003). Estos controles se deben emplear en cada ensayo para monitorizar la buena realización de la prueba y garantizar la validez de los resultados de la misma. Los valores de los controles Epi proColon Positive y Epi proColon Negative deben encontrarse dentro de sus márgenes de validez (véase Tabla 8 o Tabla 11 o Tabla 14). Si un control se encuentra fuera de sus márgenes específicos, los resultados asociados no son válidos, no deben documentarse y se debe proceder a su repetición.

Si las normas del laboratorio que disciplinan el control de calidad requieren un uso más frecuente de controles para comprobar los resultados de la prueba, atenerse a dichas normas.

14.2. Controles internos

El control interno permite la detección del ADN de ACTB (ß-actina) convertido con bisulfito . Este control interno coamplificado monitoriza la calidad de la muestra, la preparación de la muestra y la idoneidad de la concentración de ADN de la muestra.

El resultado de la PCR de Septin9 está relacionado al valor Ct o CP de la PCR ACTB (véase Tabla 9 o Tabla 12 o Tabla 15). Los valores Ct o CP de la PCR ACTB que se encuentran fuera del margen indicado invalidan el resultado de la PCR en cuestión; asimismo, valores muy altos alertan de un contenido muy bajo de bisDNA o de inhibición de la PCR.

15. Limitaciones del ensayo

- Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.
- El producto ha sido únicamente validado para la combinación del Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), del PCR Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) y del Epi proColon Control Kit (M5-02-003). No se admite la sustitución de ningún componente con kit PCR alternativos u otros métodos de extracción de ADN.
- Este producto ha sido validado para el uso con plasma derivado de sangre recogida con tubos BD Vacutainer® K2EDTA, S-Monovette® 9 ml K3E y S-Monovette® 8.5 ml CPDA. El uso de otros tipos de muestras y otros tubos de recogida de sangre no ha sido validado.
- Almacenamiento extendido de sangre en S-Monovette® 8,5 ml tubos CPDA a temperaturas elevadas puede conducir a resultados falsos positivos.
- El uso de este producto está restringido a personas con experiencia o instruidas en la realización de ensayos PCR.
- La detección del tumor colorrectal depende de la cantidad de ADN tumoral presente en la muestra; esta cantidad puede variar según el método de recogida de la muestra, las condiciones de almacenamiento, el estado del paciente (p. ej. edad, presencia de otras enfermedades) y el estadio del tumor.
- Por esta razón, el resultado de la prueba no confirma la ausencia o presencia de cáncer colorrectal. Cualquier resultado positivo de la prueba Epi proColon 2.0 CE se debería confirmar mediante colonoscopia o sigmoidoscopia.
- Se han observado resultados positivos en pacientes con diagnóstico clínico de las siguientes patologías: Gastritis crónica, esofagitis, artritis no reumatoides, cáncer de pulmón, cáncer de pecho y cáncer de próstata.
- También se han observado resultados positivos en mujeres embarazadas.
- El resultado de la prueba Epi proColon 2.0 CE debe ser evaluado en relación con otros parámetros clínicos.

16. Datos sobre la eficacia del método

16.1. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica ha sido evaluada por tres técnicos, cada uno realizando cuatro ensayos independientes con un set de 2 x 7 muestras con límite de detección (LoD) que contienen concentraciones de 0, 6, 12, 18, 25, 35 and 50 pg/ml de HeLa ADN (positiva para Septin9), resultando en 168 determinaciones. Todas las determinaciones fueron válidas usando 7500 Fast Dx de Applied Biosystems con el software SDS v1.4. De las 144 muestras LoD con HeLa ADN 133 dieron positivo, mientras 24 de 24 muestras sin HeLa ADN dieron negativo. Mediante un modelo logístico de regresión se determinó un LoD_{95} de 14 pg/ml (95 % de intervalo de confianza (IC): 9 pg/ml - 19 pg/ml) para la prueba Epi proColon 2.0 CE. En un experimento análogo determinó la sensibilidad analítica con el instrumento I de LightCycler® 480. El valor LoD_{95} estimado resultó equivalente.

16.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados de la prueba fue medida mediante la repetición de pruebas en alicuotas procedentes de nueve pools de plasma humano en EDTA. Seis de estos pools procedían de plasma de pacientes con carcinoma colorrectal diagnosticado. Tres pools procedían de pacientes sanos como control. Todos los pools fueron procesados en 6 réplicas por tres técnicos usando diferentes lotes del kit Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001) y también del kit Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002). En 54 de 54 determinaciones de Septin9 el resultado previsto fue generado con coherencia (pool con cáncer positivo al Septin9; pool sin cáncer negativo al Septin9).

16.3. **Sensibilidad clínica y especificidad**

Los resultados clínicos del Epi proColon 2.0 CE fueron determinados con 149 muestras clínicas recogidas en prospectiva de pacientes de una población de cribado con un riesgo medio pero sin evidencias de enfermedad y con 197 muestras clínicas (en modalidad caso-control) que incluían muestras procedentes de pacientes con carcinoma colorrectal confirmado a nivel histológico en todos los estadios y muestras de personas sin evidencia de enfermedad (negativos confirmados por colonoscopia).

El ADN con conversión bisulfito fue preparado de plasma procedente de sangre procesada dentro de las primeras cuatro horas después de su recogida con tubos Vacutainer® K_2EDTA (Becton Dickinson). Se obtuvieron resultados válidos de Septin9 para 346 de 346 muestras (100 %).

En la cohorte recogida en prospectiva 1 de cada 149 muestras dio un resultado positivo. La tasa de falsos positivos estimada en este grupo de pacientes es del 1 % (IC 95 %: 0 % - 4 %). Estas cifras se traducen en una especificidad clínica del 99% (IC 95 %: 96 % - 100 %).

Entre los 99 individuos de la cohorte caso-control con ninguna evidencia de enfermedad (controles), 96 muestras se determinaron negativas al Septin9 dando una especificad clínica del 97 % (IC 95 %: 91 % - 99 %), véase la Tabla 17.

De los 98 individuos con carcinoma colorrectal diagnosticado, 79 muestras resultaron positivas al Septin9, dando una sensibilidad clínica estimada del 81 % (IC 95 %: 72 % - 87 %). En los casos de cáncer colorrectal localizado y en estadio precoz, la prueba con Epi proColon 2.0 CE resultó positiva en 43 (18 estadio I, 25 estadio II) de 56 pacientes (77 %).

La tabla siguiente resume los datos obtenidos.

Tabla 17. Resumen de los datos de rendimiento clínico del Epi proColon 2.0 CE.

	Controles (cohorte de cribado)	**Controles (caso-control)**	**Todos los carcinomas colorrectales**	**Carcinomas colorrectales localizados**
Resultados válidos	149	99	98	56
Septin9 positive	1	3	79	43
Septin9 negative	148	96	19	13
Positivity	1%	3%	81%	77%

16.4. **Concordancia de los dos instrumentos de PCR en tiempo real**

La concordancia de Epi proColon 2.0 CE entre el 7500 Fast Dx System Applied Biosystems y el instrumento I de LightCycler 480 ha sido determinada en una medición comparada con 48 muestras de plasma de pacientes con carcinoma colorrectal en todos los estadios y confirmado histológicamente y 52 muestras de individuos sin evidencia de enfermedad en el colon, tras comprobarse mediante colonoscopia. En el 93 % (93/100) de los casos, los dos sistemas de medida del Septin9 concuerdan en los resultados.

16.5. **Interferencia**

No se han observado interferencias entre los controles experimentales ni entre las muestras reactivas ni no reactivas comprobadas con niveles elevados de ADN genómico sin metilar (100 ng/ml), de bilirubina (0,20 mg/ml), de hemoglobina (1 mg/ml), de trigliceridos (12 mg/ml), de proteína (albumina de suero humano) (120 mg/ml), eritrocitos (0,4% v/v), K_2EDTA (20 mg/ml), colesterol (5 mg/ml), ácido úrico (0,235 mg/ml) y glucosa (10 mg/ml).

17. Significado de los símbolos

Símbolo	Significado
	Consultar las instrucciones de uso
REF	N. de refencia
IVD	Producto sanitario para el diagnóstico *in vitro*
LOT	N. de lote
	Fecha de caducidad
	Fabricante
	Almacenar a la temperatura indicada
Σ	Número de pruebas
	No reutilizar

18. Referencias

1 deVos, T et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. Clinical Chemistry 55:7, 1337-46 (2009)

2 Lofton-Day, C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. Clinical Chemistry 54:2, 414-423 (2008)

3 Model, F. et al. Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. Mol Cancer Res 5, 153-163 (2007)

4 Eads, C.A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Research, Volume 28, Issue 8, e32 (2000)

19. Contacto

Epi proColon 2.0 CE es un producto de:

Epigenomics AG

Geneststr. 5

10829 Berlín, Alemania

Para más información y asistencia, enviar un e-mail o llamar a:

support@products.epigenomics.com

Tel.: 0049 30 24345 222
Fax: 0049 30 24345 555

Nota para el comprador

Epi proColon (Epi proColon®) es una marca registrada de Epigenomics AG. Todas otras marcas registradas y nombres incluidos en este documento son propiedad de sus respectivos propietarios.

LightCycler® 480 System es una marca registrada de F. Hoffmann-La Roche Ltd.
Applied Biosystems®, MicroAmp® son marcas registradas de Life Technologies Corporation; DynaMag™ es una marca registrada de Life Technologies Corporation.
BD Vacutainer® es una marca registrada de Becton Dickinson Inc./Corporation.
S-Monovette® es una marca registrada de Sarstedt AG & Co.
Thermomixer®, Research®, Reference®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S.®, Combitips plus® son marcas registradas de Eppendorf AG; Safe LockTM es una marca registrada de Eppendorf AG.
HandyStep® es una marca registrada de Brand GmbH + Co KG.

Con la adquisición de este producto el comprador adquiere el derecho de usar determinadas patentes de Roche. Este derecho está limitado al suministro de servicios en materia de diagnóstico *in vitro* con muestras de procedencia humana. La compra no conlleva derechos generales sobre patentes ni sobre otras licencias que vayan más allá de los derechos de uso.